

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА ЧЕТВЕРТЬ ВЕКА СПУСТЯ

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

В 1947 г. М.Е.Лобашев выдвинул физиологическую (паранекротическую) гипотезу мутационного процесса. Согласно этой гипотезе само по себе повреждение генетического материала как следствие действия мутагена еще не есть мутация, но мутирование есть сложный физиологический процесс, при котором повреждение генетического материала может быть опосредованным, и становление мутации осуществляется в процессе репарации этого повреждения по принципу нетождественного восстановления (Лобашев, 1947, 1967, 1975). Термин "паранекроз" подчеркивает лишь одну сторону этого процесса, а именно обратимость повреждений. Другая, не менее существенная сторона - это нетождественное восстановление как принцип становления мутаций. Физическую сущность паранекротических явлений М.Е. Лобашев усматривал в денатурации макромолекул клетки и прежде всего в "денатурации" генетического материала.

В данном обзоре мы рассмотрим новейшие экспериментальные обоснования гипотезы М.Е.Лобашева с целью показать, что в настоящее время основные положения этой гипотезы могут служить достаточно универсальной, общей теорией мутационного процесса. Предметом обсуждения будут четыре основных аспекта этой теории: 1) собственно физиологическая сущность мутационного процесса, 2) возможность опосредованного действия мутагенов, 3) роль в мутагенезе конформационных (денатурационных) превращений ДНК, 4) нетождественное восстановление по принципу становления мутации.

"Физиологичность" мутационного процесса

Основные доводы М.Е. Лобашева в пользу физиологической сущности мутационного процесса сводились к следующему. Мутагенные эффекты зависят от уровня организации и стадии развития, на которых находится изучаемый объект. Действие мутагена зависит от генетической конституции объекта, что находит свое выражение в разной мутабельности гибридов, линий и особей разных полов. Существенным моментом гипотезы М.Е.Лобашева является возможность адаптации к мутагену, т.е. "привыкание" или возникновение устойчивости к агенту, сопровождаемое понижением мутабельности объекта. Очевидно, что перечисленные явления находятся во взаимной причинно-следственной связи, их рас-

членение до некоторой степени условно, и в настоящем, по-видимому, можно принять, что все они суть явления физиологической природы.

В настоящее время имеется возможность показать на примере действия одного и того же мутагена, как конкретно проявляются в мутагенезе физиологические особенности объекта. Мы имеем в виду действие аналогов оснований и в первую очередь 5-бромдезоксипуридина (БДУР).

Принято считать (и это мнение солидно документировано многочисленными опытами с бактериями и фагами; см.: Drake, 1970), что БДУР, включаясь в ДНК, вызывает исключительно замены оснований типа транзиций.

Однако уже у фагов можно наблюдать различия в мутагенном действии БДУР (или бромпурицила - БУ). У фага T4 он вызывает транзиции преимущественно в направлении ГЦ → АТ, а у фага S13 (который в отличие от T4 содержит одностороннюю ДНК) - в противоположном направлении АТ → ГЦ (Vacker, Tessman, 1968). Авторы считают, что наблюдаемые различия обусловлены различием аппаратов репликации ДНК у этих фагов.

Следует подчеркнуть, что проникновение БДУР в клетку и превращение его в нуклеозидтрифосфат вовсе не являются актами мутагенеза. Мутационный процесс (по крайней мере у фагов) начинается с включения БДУР в ДНК и завершается становлением мутаций в ходе последующей репликации. Ведущая роль здесь принадлежит ДНК-полимеразе. В случае с БДУР это положение доказывают опыты Дрейка и Грининг, наблюдавших полное подавление мутагенной способности БДУР по отношению к штаммам фага T4 с антимутагенной ДНК-полимеразой (Drake, Greening, 1970). БДУР не подавлял размножение этих фагов, т.е. антимутагенная ДНК-полимераза была способна с одинаковой точностью реплицировать как исходную ДНК фага, так и ДНК с включенным в нее БДУР. Это означает, что физико-химические параметры БДУР (в частности большая константа таутомерного равновесия по сравнению с тимидином) не играют той ведущей роли в мутагенезе, каковая до недавних пор им отводилась (см. Данилов, Квенцель, 1971).

Вместе с тем тот же БДУР в клетках млекопитающих и человека способен вызывать разрывы хромосом (Hsu, Somers, 1961; Engel e.a., 1967). Цитогенетические эффекты в животных клетках обнаружены и для других мутагенных для бактерий и фагов аналогов оснований, таких как 2,6-диаминопурин (Гудкова и др., 1970), или 6-гидроксиламинопурин (Beisele, 1963), который вызывает замены оснований у фага T4 (Freese, 1968) и у дрожжей (Хромов-Борисов, Симаров, 1973). Таким образом, у разных объектов один и тот же агент способен вызывать мутационные изменения разных типов. Показано, что в клетках млекопитающих БДУР включается в ДНК. Если клонировать клетки на среде, содержащей БДУР, то можно отобрать линии, устойчивые к этому агенту. Биохимически было доказано, что возникшая устойчивость связана либо с нарушением активного транспорта БДУР в клетку (Breslow, Goldsby, 1969), либо с потерей активности тимидинкиназы (Deletion ... , 1963). И в том, и в другом случаях БДУР теряет способность включаться в ДНК клеток. У бактерий подобные мутанты, устойчивость которых к БДУР связана с нарушением его включения в ДНК, известны давно (Zamenhof e.a., 1956). Понятно, что БДУР или БУ не являются мутагенами для тех микроорганизмов, у которых отсутствует тимидинкиназа. Это справедливо, в частности, для дрож-

жей (Brusick, Mayer, 1973; Prakash, Sherman, 1973), у которых к тому же отсутствует активный транспорт нуклеозидов. Другие аналоги оснований, такие как 2-аминопурин и 2,6-диаминопурин, широко применяемые в качестве активных мутагенов для бактерий (Drake, 1970), для дрожжей также не являются мутагенами (Brusick, Mayer, 1973; Prakash, Sherman, 1973). 2-аминопурин является слабым мутагеном лишь для мутантов дрожжей с нарушенным синтезом пуринов (Soga e.a., 1973). Это объясняется узкой специфичностью соответствующей фосфорибозилтрансферазы дрожжей и подтверждается тем, что у дрожжей можно получить мутанты, чувствительные к 2,6-диаминопурину, чувствительность которых обусловлена изменением этого фермента (Lomax, Woods, 1969).

Однако кроме таких легко объяснимых случаев влияния метаболизма и генотипа на мутационный процесс существуют и менее тривиальные факты. Так, например, Хсу и Сомерс (Hsu, Somers, 1962) удалось выделить линию устойчивых к БДУР (25мкг/мл) клеток фибробластов мышей. В клетках этой линии БДУР продолжал активно включаться в ДНК, но не вызывал хромосомных разрывов. То-есть, видимо, это означает, что для осуществления разрывов хромосом простого включения БДУР в ДНК недостаточно, а может быть, и не необходимо. Возможно, что цитогенетические эффекты БДУР скорее связаны с его токсическим действием, нежели с включением в ДНК (см.: Kaufman, Gay, 1970). Это предположение косвенно подтверждается тем, что недавно получены мутанты *Bacillus subtilis*, в ДНК которых активно включается БДУР, но без общего подавления роста клеток (Bishop, Sueoka, 1972).

Нетривиальным аспектом физиологической теории мутационного процесса следует считать возможность возникновения не только устойчивости к мутагену, но и зависимости от мутагена. Такая возможность подтверждается следующим фактом. В культуре клеток меланомы сирийского хомяка удалось отобрать линию клеток, зависящих от БДУР, такие клетки не могли расти без него и включали БДУР в ДНК (Davidson, Bick, 1973). В связи с этим фактом заманчивым представляется получение мутантов, для которых БДУР (или другой аналог) был бы антимутагеном. Намек на такую возможность содержится в цитированной работе Дрейка и Грининга, у некоторых мутантов фага T4 с антимутагенной ДНК-полимеразой БДУР и 2-аминопурин в два раза понижали уровень спонтанного мутирования (Drake, Greening, 1970). Это может служить прямым доказательством того, что мутагенез определяется ферментами репарации и репликации в большей мере, чем мы думаем, и в меньшей мере зависит от физико-химических свойств (например, от таутомеризации) оснований.

Итак, на примере одного мутагена - 5-бромдезоксипуридина - мы можем наблюдать зависимость его действия от физиологических свойств объекта: уровня биологической организации, от метаболизма и от генетической конституции. Естественно, эти закономерности не являются прерогативой одного БДУР или только аналогов оснований, но справедливы и для других мутагенов. Поэтому рассмотрим еще несколько примеров.

М.Е.Лобашев (1975, с. 9) отмечал, что "действие мутагена контролируется сложной цепью процессов, которые нередко маскируют эффект

или препятствуют его проявлению". К числу таких процессов он относил, в частности, проницаемость и метаболическую активность клеток. Действительно, проницаемость клеточной мембраны может определять устойчивость или чувствительность клетки к мутагену. Например, описаны мутанты фага T2, которые снижают проникновение акрифлавина в инфицированную клетку бактерии хозяина и вследствие этого устойчивы к действию этого мутагена (Silver, 1965); другие мутанты, напротив, повышают проницаемость бактериальной клетки и являются чувствительными к акридинам (Silver, 1967; см. также: Nakamura, Suganuma, 1972). Сверхчувствительные штаммы *Salmonella typhimurium*, в которых сочетаются повышенная проницаемость и непрепарируемость мутационных изменений, нашли практическое применение для оценки мутагенной активности различных факторов внешней среды (Ames e.a., 1973; Carcinogens..., 1973).

Убедительные доказательства метаболических превращений мутагенов получены с использованием современной методики "воздействия, опосредованного хозяином" (host mediated assay). В этих опытах обнаружены такие агенты, которые не проявляли мутагенную активность по отношению к интактным микробным клеткам, но становились мутагенами при воздействии, опосредованном хозяином (Brusick, Mayer, 1973; Legator, Flamm, 1973). Недавно эта методика была модифицирована: обработка бактерий проводится просто в гомогенатах тканей (Carcinogens..., 1973) или в искусственном желудочном соке (Endo, Takahashi, 1973). При помощи этой техники получено, например, доказательство того, что природное соединение метилгуанидин способно нитрозироваться желудочным соком, и в результате образуется метилнитрозоцианамид, мутагенная активность которого в 16 раз превышает активность широко известного нитрозогуанидина (Endo, Takahashi, 1973).

Рассмотрим теперь современные данные о генетическом контроле мутационного процесса. Бурно развивающиеся исследования в этой области позволяют наконец вплотную подойти к изучению собственно физиологии мутационного процесса.

Мутации генов, контролирующих некоторые компоненты систем репликации, рекомбинации и репарации, часто проявляют мутаторный эффект. К настоящему времени идентифицированы функции лишь нескольких генов-мутаторов. Прежде всего следует назвать ген 43 у фага T4, контролирующей ДНК-полимеразу фага. Некоторые температурочувствительные мутанты фага по этому гену проявляют повышенную мутабельность. При этом возникают как замены оснований, так и вставки-выпадения отдельных нуклеотидов (Drake, 1973). Другие уже упоминавшиеся мутанты по гену 43 обладали антимутагенной ДНК-полимеразой, т.е. проявляли пониженную мутабельность, причем как спонтанную, так и под действием химических мутагенов (Drake, Greening, 1970; Drake, 1973). Аналогичный мутаторный эффект открыт у мутантов *Escherichia coli* по гену *dnaE*, кодирующему ДНК-полимеразу III, ответственную за репликацию бактериальной хромосомы (Hall, Brammar, 1973), а также у *Bacillus subtilis* (Gass, Cozzarelli, 1973; Bazill, Gross, 1973). Мутагенное и антимутагенное действие проявляют также мутации гена 32 фага T4. Этому гену соответствует так называемый белок Аль-

бертса. Белок этот кооперативно связывается с одной из нитей ДНК и поддерживает ее в растянутой конформации, необходимой для оптимального спаривания оснований при репликации. Таким образом, определенная конформация нитей ДНК в ходе репликации столь же важна для точности репликации, как и специфичное спаривание оснований и функциональное состояние ДНК-полимеразы (Drake, 1973).

Многие гены-мутаторы обладают высокой избирательностью (см.: Камнева, 1973; Cox, 1973; Siegel, Kamel, 1974). Уникальным в этом отношении является мутатор Трефферса (*mutT1*) у кишечной палочки, который вызывает только трансверсии и исключительно одного направления $AT \rightarrow CG$. Мутатор Зигела (*mutS1*) вызывает, по-видимому, только транзиции. Мутанты кишечной палочки по ДНК-полимеразе I обладают повышенной частотой возникновения делеций (Couckell, Yanofsky, 1970; Ishii, Kondo, 1972). Мутагенная ДНК-полимераза I обнаружена также в раковых клетках человека (Springgate, Loeb, 1973). Другие мутаторы вызывают как замены оснований, так и вставки или выпадения нуклеотидов (Siegel, Kamel, 1974). Вставки и выпадения вызывает мутатор фон Борстеля у дрожжей (*Mutants of yeast...*, 1973). К мутаторам следует отнести также гены, нарушающие расхождение хромосом у дрожофилы (Baker, Hall, 1974). Однако продукты большинства из перечисленных мутаторов и их функция пока не идентифицированы.

Еще менее изученным представляется мутагенное действие вирусов (Bartsch, 1970; Nichols, 1970), фагов (Boram, Abelson, 1971; Shimada e.a., 1973) и эписом или так называемых "контролирующих элементов" (Starlinger, Saedler, 1972; Green, 1973; Fincham, 1973). К этому же типу загадочных мутационных явлений относятся, по-видимому, "псевдомутации" или "парамутации" (Drake, 1970; Auerbach, Kilbey, 1971; Brink, 1973), явление "множественной мутабельности" (Итавичис, Инге-Вечтомов, 1972). Генетико-физиологические механизмы этих комплексных явлений практически неизвестны, и здесь преобладают пока гипотезы.

Итак, гены-мутаторы способны вызывать мутации любого типа: замены оснований, вставки и выпадения нуклеотидов, перестройки хромосом и геномные мутации. Из исследований механизмов действия генов-мутаторов логически вытекает возможность опосредованного действия мутагенов. А именно: мутаген, модифицируя продукт нормальной аллели такого гена, может имитировать эффект его мутаторной аллели.

Опосредованный мутагенез

Можно представить себе ситуацию, когда мутаген не повреждает генетический материал, но действует опосредованно, модифицируя ферменты реплицирующие или репарирующие ДНК. Такие модифицированные ферменты могут имитировать действие мутаторных ДНК-полимераз или других продуктов генов-мутаторов. Убедительным доказательством мутагенеза, опосредованного белками, является мутагенное действие аналогов аминокислот на

Ustilago maydis (Lewis , Tarrant , 1971; см. также обсуждение этих данных: Orgel , 1973). Известно, что использованные в цитируемой работе аналоги аминокислот: п-фторфенилаланин, этионин и канаваин - способны включаться в белки, имитируя ошибки трансляции. Авторы, получив мутагенный эффект, сравнимый с таковым для нитрозогуанидина и УФ-света, приходят к выводу, что "биохимические процессы в клетке, которые не касаются ядерной функции непосредственно, играют важную роль в индукции мутаций" (Lewis , Tarrant , 1971). Л.Оргел конкретизирует этот вывод: "Ошибки в синтезе белка должны иногда приводить к образованию молекул "мутаторной" ДНК-полимеразы, которая будет реплицировать ДНК неаккуратно" (Orgel , 1973). Впоследствии мутагенная активность аналогов аминокислот была показана авторами по отношению к другим эукариотам (Talmud , Lewis , 1974 a,b). К этому же роду явлений можно отнести изменение специфичности ДНК-полимеразы фэга Т4 в присутствии ионов двухвалентного марганца Mn^{2+} (Hall , Lehman , 1968; Drake , 1970).

Причиной опосредованного мутагенеза могут служить не только изменения специфичности или ингибирование ферментов, реплицирующих и репарирующих ДНК, но и активация или высвобождение ферментов, разрушающих (нуклеазы) или модифицирующих (например, метилазы) ДНК. Подтверждение этого предположения можно видеть в том, что в клетках с поврежденными лизосомами часто наблюдаются разрывы хромосом вследствие высвобождения нуклеаз (Paton , Allison , 1970; см., однако: Hittelman, 1972). У дрожжей наблюдается активация митохондриальной дезоксирибонуклеазы под влиянием акридинов и этидий бромидов - соединений, которые активно вызывают цитоплазматические мутации (Paoletti e.a., 1972). Кроме интеркаляции в двойную спираль ДНК, эти агенты, оказывается, способны кооперативно связываться с мембранами (Silver e.a., 1968; Drake, 1970; Mahler, Perlman , 1972). Некоторые поверхностно-активные вещества (детергенты), способные разрушать мембраны, также индуцируют у дрожжей цитоплазматические мутации (Toe e.a., 1969; Julian e.a., 1973). Относительно причинно-следственной связи между мутагенезом и ферментативной модификацией ДНК нет прямых данных. Известно, однако, что в облученных клетках *Escherichia coli* усиливается метилирование ДНК (Whitfield, Billen , 1972), метилирование ДНК активируется также под действием мутагенных и канцерогенных нитрозосоединений (Magee , Vornes , 1971). К этому остается добавить, что действие мутатора Кирхнера сопровождается образованием в ДНК метилированного производного гуанина (Хейс, 1965, с. 163).

Другие примеры предположительно опосредованного действия мутагенов можно найти в нашей статье, специально посвященной этому вопросу (Хромов-Борисов, 1972; см. также: Kondo , Ichikawa , 1973). Возможные пути опосредованного действия излучений на генетический материал интенсивно обсуждаются также в радиобиологии (Кузин, 1970, 1973).

Итак, возможны два крайних варианта повреждения генетического материала: один - исключительно непосредственное действие мутагена; другой - напротив, исключительно опосредованное, "диффузное" (по Хугу и Келлереру, 1969), действие. Очевидно, эти две противоположности не являются взаимоисключающими, но, напротив, они взаимодополнительны (компле-

ментарны). И в том и в другом случаях становление мутации опосредуется аппаратами генетической репарации и репликации. Можно предположить, что для достижения наибольшего мутагенного эффекта необходима координация непосредственного и опосредованного путей мутагенеза.

В заключение этого раздела мы вынуждены признать, что, несмотря на кажущуюся бесспорность существования окольных путей мутагенеза, этот аспект теории остается наименее изученным экспериментально.

Роль конформационных (денатурационных) изменений биомакромолекул в мутагенезе

По схеме М.Е.Лобашева начальное действие мутагена создает в клетке состояние, называемое "паранекрозом" (Лобашев, 1947, 1975). В современной литературе такой стереотипный комплекс ответных реакций клетки на любое неблагоприятное воздействие (стресс) иногда называют адаптационным синдромом на клеточном уровне (Eyring, Johnson, 1971; Календо, 1972). Физическую сущность паранекротического состояния составляет "сравнимая денатурация" макромолекул в клетке (Браун, 1966). Несмотря на то, что представления о денатурации макромолекул претерпели существенные изменения, эта общая схема обратимости повреждений клетки и ее генетического материала осталась в силе. Если раньше термином "денатурация" обозначали любую потерю природных свойств и любое изменение структуры молекулы вплоть до разрыва ковалентных связей, то теперь денатурацией обычно называют только разрыв слабых внутри- и межмолекулярных связей (водородных, ионных, ван-дер-ваальсовых, диполь-дипольных, "тирофобных") и связанные с этим конформационные изменения молекулы (Жолдасов, 1968; Конев и др., 1970; Брандтс, 1973; Ламри, Билтонен, 1973).

Что касается повреждений генетического материала мутагеном, то здесь мы встречаемся как с конформационными изменениями ДНК, так и с преобразованием ковалентных связей. Причем эти процессы оказываются тесно сопряженными: локальная денатурация ДНК стимулирует изменение ее ковалентного остова, а изменение ковалентных связей способствует ее денатурации. Известно, что при расплетании нитей ДНК в момент ее удвоения или вследствие денатурации (Salganik, 1972) реакция с мутагеном протекает быстрее; вирусы с одноцепочечной ДНК более чувствительны к мутагенам, чем вирусы с двухцепочечной ДНК (Tessman, 1968); некоторые мутагены практически инертны по отношению к интактным частицам ВМ, вызывают мутации, если обрабатывать чистую РНК вируса (Singer, Fraenkel-Conrat, 1969; см. также: Loprieno, 1971). Соотношение и ход различных фотопродуктов в ДНК, облученной УФ-светом *in vivo*, зависят от конформации и окружения ДНК, а следовательно, от физиологических условий в клетке (Stafford, Donnelian, 1968). Образование димеров тимина попросту невозможно без соответствующих локальных изменений конформации ДНК (Longworth, 1968). Конформационное изменение двойной спирали ДНК (ее разворачивание) необходимо также для включения (интеркаляции) акридинов (Drake, 1970).

Эти положения подтверждаются данными о действии температуры на мутационный процесс (Lindgren, 1972). В настоящее время почти безоговорочно принимается, что мутагенами могут быть лишь агенты, способные разорвать или образовать ковалентную связь. Иными словами, общепринято, что энергия активации для мутационного акта составляет 2,5 – 3 эВ (Тимофеев-Ресовский и др., 1966; Шредингер, 1972). Однако это не совсем так. Во многих опытах, особенно в опытах с микроорганизмами, были получены гораздо меньшие значения энергий активации, вплоть до 0,2 – 0,4 эВ (Lindgren, 1972). Тщательное исследование спектра мутаций, индуцируемых температурой у *Serratia marcescens* и *Escherichia coli* привело авторов (Ahmed, Kaplan, 1964) к выводу, что для мутагенеза существуют по крайней мере три разные реакции с различными значениями энергий активации.

Если пытаться более содержательно интерпретировать приведенные оценки энергий активации, то с необходимостью следует признать, что мутагенами могут быть не только агенты, способные изменить ковалентные связи молекул, но и менее активные, приводящие к изменениям конформации. (В скобках заметим, что такие низкие значения энергий активации лучше согласуются также с бытующим представлением о роли в мутагенезе таутомерных переходов в азотистых основаниях ДНК (Данилов, Квенцель, 1971).) Увеличение скорости мутирования пониженными температурами (Lindgren, 1972; Лобашев, 1974) можно в настоящее время объяснить тем, что при замораживании растворов биополимеров также происходит их денатурация (Брандтс, 1973; Ламри, Билтонен, 1973). Как отмечал М.Е.Лобашев, это означает, что подобно другим физиологическим реакциям мутационный процесс характеризуется U-образной температурной зависимостью (см.: Rose, 1967; Wersuhn, 1967; Tokunaga, 1970).

Итак, опыты по влиянию температуры на мутационный процесс недвусмысленно говорят о том, что одной из причин мутаций является перестройка слабых связей и изменение конформации биомолекул. По мнению С.В.Коневы с соавторами (Конев и др., 1970), клетка пронизана единой сетью слабых межмолекулярных связей и ответы клетки на самые разнообразные внешние воздействия несут все характерные черты кооперативного процесса; например, модификация одного из видов белка может вызвать генерализованные, далеко идущие мембранные перестройки как внутри отдельной органеллы, так и во всей клетке (Конев и др., 1970). Такие конформационно-кооперативные перестройки, с одной стороны, зависят от физиологического состояния клетки, а с другой стороны, сами создают новое ее физиологическое состояние.

Изложенные представления хорошо согласуются с обсуждавшейся выше возможностью опосредованного белками действия мутагенов. Так, тепловой обработкой можно изменить специфичность рибонуклеазы (Москвитина, Будовский, 1966). Очевидно, что подобные эффекты можно ожидать и для других белков. Поэтому не следует ограничивать роль стерических факторов в мутагенезе лишь влиянием конформации ДНК на ее реакцию с мутагеном. Не только изменения конформации ДНК, но и изменения конформации белков, участвующих в репликации, рекомбинации и репарации ДНК, могут оказаться мутагенными.

Становление мутации по принципу нетождественного восстановления

"По своей структуре ген является гигантской молекулой, которая способна только к дискретным изменениям, сводящимся к перестановке атомов с образованием изомерной молекулы. Для удобства я продолжаю называть это изомерным переходом, хотя было бы нелепостью исключать возможность какого-либо обмена с окружающей средой", — писал Э.Шредингер в 1941 г. (Шредингер, 1972, с. 59). После осознания уникальной роли ДНК и торжества принципа комплементарности стало ясно, что для процесса мутирования недостаточно такого "изомерного" превращения, но необходимо закрепление возникшего изменения с помощью последующего акта репликации, т.е. именно по принципу "нетождественного восстановления", когда, например, на место измененного основания становится другое природное азотистое основание.

Как уже говорилось, точность репликации во многом зависит от структуры ДНК-полимеразы. Поэтому многие предмутационные состояния могут возникать либо как прямое действие мутагена на ДНК, либо окольным путем — посредством модификации ДНК-полимеразы. И в том, и в другом случае необходима последующая репликация для закрепления мутации. Но если бы в становлении мутации участвовала только репликация, то потомство мутировавшей клетки должно было бы быть мозаичным, т.е. содержать как исходные, так и мутантные клетки. В действительности же очень часты случаи проявления полных мутантных клонов. Для объяснения этого и других явлений, таких как "последствие", "отсроченные" эффекты, "резонансный", "продленный" мутагенез и т.п., активно привлекаются современные данные о репарации генетических повреждений в клетке (Дубинин, 1972).

В настоящее время изучение генетической репарации есть столь обширная область знаний, что обозреть ее здесь не представляется возможным. Да это и не входит в наши намерения. Для нас важно, что современные схемы участия репарационных систем в становлении мутаций во многом напоминают схему М.Е.Лобашева. По этим схемам первичное изменение ДНК не есть мутация. Чаще всего модификация ДНК вследствие действия мутагена на клетку влечет за собой локальное изменение вторичной структуры. Такое изменение служит сигналом для индукции репарирующих ферментов, потому что часто данный измененный участок ДНК вообще не способен участвовать в репликации. Ферменты системы репарации "узнают" измененный участок. Среди них имеются эндонуклеазы, которые способны разрезать одну из нитей ДНК, и далее — уже с помощью экзонуклеазы (и, возможно, при участии фосфоорилазы) — вырезается довольно большой кусок полинуклеотида. Образовавшаяся "брешь" застраивается по принципу комплементарности новой цепью с помощью фермента типа ДНК-полимеразы I. Воссоединение новой и старой нитей осуществляется лигазами (см.: Парибок, 1970; Захаров, Кривиский, 1972; Howard-Flanders, 1973; Witkin, George, 1973). Существенным моментом здесь является репликация ДНК с помощью репаративной ДНК-полимеразы. По-видимому, имеется определенная вероятность в про-

цессе этой репарационной репликации реализовать имеющееся изменение структуры ДНК как мутацию. Таким образом, согласно этой схеме становление мутации вистину осуществляется как нетождественное восстановление генетического материала.

Из представленной здесь картины следует, что, несмотря на разнообразие первичных поражений генетического материала и несмотря на множество путей, по которым осуществляются эти первичные поражения, набор конечных их реализаций в виде мутаций резко ограничен. Таким образом, остается справедливым тезис М.А.Лобашева о том, что мутирование есть неспецифический, т.е. стереотипный, ответ клетки на действие мутагена. Это означает, с одной стороны, что одно и то же повреждение генетического материала может приводить к мутациям разного типа, а с другой стороны, что разные повреждения могут вызывать один и тот же тип мутаций или один и тот же спектр мутаций. Если же мутаген, который, казалось бы, заведомо должен вызывать различные типы мутаций, в опыте вызывает преимущественно один тип мутаций, то это есть указание на участие каких-то цитофизиологических механизмов. Прямые подтверждения этих следствий можно найти в работе Майстриха и Дрейка (Meistrich, Drake, 1972), изучавших мутагенные эффекты димеров тимина у фага Т4. Авторы приходят к следующим выводам. Непосредственным предмутационным состоянием скорее всего является образование бреши, т.е. свободных однонитевых концов ДНК, а не первичные фотопродукты. Мутации происходят в сайтах, удаленных от первичного повреждения, о чем свидетельствует индукция транзиций ГЦ \rightarrow АТ, а не противоположного направления, как следовало ожидать. Один тип предмутационного повреждения (димеры тимина) может вызывать по меньшей мере два типа мутаций: транзиции ГЦ \rightarrow АТ и вставки и выпадения нуклеотидов. Авторы считают, что летальные УФ-повреждения могут инициировать один и тот же процесс, который производит определенный спектр мутаций. Все это полностью согласуется с представлениями физиологической теории мутационного процесса.

Современная теория мутагенеза все чаще привлекает представления о мутагенезе как о сложном физиологическом процессе. Прогресс, достигнутый за последние годы, стал возможен именно потому, что было обращено внимание на физиологию и генетический контроль мутационного процесса. Пророчески в этом отношении звучат слова М.Е.Лобашева: "Монополия одной из биологических дисциплин на проблему изменчивости оттягивает ее разрешение, так как одних генетических или других односторонних знаний и методов оказывается недостаточно для этого. На современном этапе необходим синтез знаний разных наук для решения любой общей биологической проблемы, а тем более - в исследовании процессов изменчивости" (Лобашев, 1974, с.3).

Summary

The modern status of the Lobashev's physiological theory of mutational process is discussed. Attention is drawing to the main aspects of the theory: mutation as physiological process; "mediated" mutagenesis; the role of conformational changes in mutagenesis; the principle of "non-identical repairing".

Указатель литературы

- Браун А. Д. Теории клеточного повреждения. - В кн.: Руководство по цитологии. Т. 2. М.-Л., "Наука", 1966, с. 161 - 172.
- Брандтс Дж. Ф. Конформационные переходы белков в воде и в смешанных водных растворителях. - В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М., "Мир", 1973, с. 174 - 254.
- Гудкова Э. В., Митрофанов Ю. А., Шавельзон Р. А. Цитогенетический эффект 2,6-диаминопурина. - Изв. АН СССР, сер. биол., 1970, № 4, с. 508 - 514.
- Данилов В. И., Квенцель Г. Ф. Электронные представления в теории точечных мутаций. Киев, "Наукова думка", 1971. 82 с.
- Дубинин Н. П. Нерешенные вопросы современной молекулярной теории мутаций. - В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов. М., "Наука", 1972, с. 5 - 36.
- Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М., "Мир", 1968. 364 с.
- Захаров И. А., Кривиский А. С. Радиационная генетика микроорганизмов. М., Атомиздат, 1972. 295 с.
- Календо Г. С. О возможности адаптационного синдрома - стресса на клеточном уровне и его роли в реакции клетки на облучение. - "Усп. совр. биол.", 1972, т. 73, № 1, с. 59 - 80.
- Каменева С. В. О механизмах действия генов-мутаторов. - В кн.: Чувствительность организмов к мутагенным факторам и возникновение мутаций. Вильнюс, 1973, с. 53 - 65.
- Конев С. В., Аксентьев С. Л., Черницкий Е. А. Кооперативные переходы белков в клетке. Минск. "Наука и техника", 1970. 220 с.
- Кузин А. М. Структурно-метаболическая гипотеза в радиобиологии. М., "Наука", 1970. 222 с.
- Кузин А. М. Молекулярная радиобиология клеточного ядра. М., Атомиздат, 1973. 208 с.
- Ламри Р., Билтонен Р. Термодинамические и кинетические аспекты конформаций белков в связи с физиологическими функциями. - В кн.: Структура и стабильность биологических макромолекул. М., "Мир", 1973, с. 7 - 173.
- Лобашев М. Е. Физиологическая (паранекротическая) гипотеза мутационного процесса. - Вестник Ленингр. ун-та, 1947, № 8, с. 10-21.
- Лобашев М. Е. Генетика в Ленинградском университете. - В кн.: Исслед. по генетике, № 3. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1967, с. 3-18.
- Лобашев М. Е. Физиологическая гипотеза мутационного процесса. - В кн.: Исслед. по генетике, № 6. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1971, с. 3-15.
- Москвитина Т. А., Будовский Э. И. Термическая модификация панкреатической рибонуклеазы. - Докл. АН СССР, 1966, т. 171, № 4, с. 999 - 1001.

П а р и б о к В. П. (ред.) Современные проблемы радиобиологии.
Т. I. Пострадиационная репарация. М., Атомиздат, 1970. 335 с.

Т и м о ф е е в - Р е с о в с к и й Н. В., И в а н о в В. И
Г л о т о в Н. В. Некоторые вопросы радиационной генетики. - В кн.:
Актуальные вопросы современной генетики. М., Изд-во Моск. ун-та, 1966,
с. 412 - 433.

Х э й с У. Генетика бактерий и бактериофагов. Основы генетики и
молекулярной биологии. М., "Мир", 1965. 555 с.

Х р о м о в - Б о р и с о в Н. Н. Опосредованный мутагенез. - В
кн.: Химический мутагенез и создание селекционного материала. М., "На-
ука", 1972, с. 86 - 92.

Х р о м о в - Б о р и с о в Н. Н., С и м а р о в Б. В. Специфич-
ность мутагенного действия 6-гидроксиламинопурина на дрожжи *Saccharomy-
ces cerevisiae*. - В кн.: Конф. по генетике промышленных микроорга-
низмов 10 - 14 декабря 1973 г. Тезисы докладов. Цахкадзор, 1973, с.42.

Х у г О., К е л л е р е р А. Стохастическая радиобиология. М.,
Атомиздат, 1969. 183 с.

Ч и т а в и ч ю с Д. В., И н г е - В е ч т о м о в С. Г. Мно-
жественные мутанты *Saccharomyces cerevisiae*. Сообщение I. Получение и
общая характеристика. - "Генетика", 1972, т. 8, № 1, с. 95 - 101.

Ш р е д и н г е р Э. Что такое жизнь с точки зрения физика. М.,
Атомиздат, 1972. 88 с.

A h m e d S.I., K a p l a n R.W. Unterschiedliche Typen-
spektren der spontanen und hitzeinduzierten Auxotrophenmutationen bei
Serratia marcescens CV/rc₃ und *Escherichia coli* Harvard. - Arch.Mikro-
biologie, 1964, N 3, S. 268-281.

A m e s B.N., L e e F.D., D u r s t o n W.E. An improved
bacterial test system for detection and classification of mutagens and
carcinogens. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1973, v.70, N 3, p.782-786.

A u e r b a c h C., E i l b e y B.J. Mutation in eukaryotes.
- Ann. Rev. Genet., 1971, v.5, p.163-218.

B a k e r B.S., H a l l J.C. Meiotic mutants: genic cont-
rol of recombination and disjunction in *Drosophila*. - In: Genetics
and Biology of *Drosophila*, v.1 (ed. by E.Novitski, M.Ashburner). New
York. Academic Press, 1974.

B a k e r R., T e s s m a n I. Different mutagenic specifi-
cities in phages S13 and T4: in vivo Treatment with N-methyl-N'-nitro-
N-nitrosoguanidine. - J.Mol.Biol., 1968, v.35, N 3, p.439-448.

B a z i l l G.W., G r o s s J.D. Mutagenic DNA polymerase
in *B.subtilis*. - Nature New Biol., 1973, v.243, N 129, p.241-243.

B e i s e l e J.J. Some morphological effects of alkylating
agents. - Exptl Cell Res., Suppl. 9, 1963, p.525-534.

B i s h o p R.J., S u e o k a N. 5-bromouracil-tolerant mu-
tants of *Bacillus subtilis*. - J. Bacteriol., 1972, v.112, N 2,
p.870-876.

B o r a m W., A b e l s o n J. Bacteriophage Mu integration:
on the mechanism of Mu-induced mutations. - J. Mol. Biol., 1971, v.62,
N 1, p.171-178.

B a r t s c h H.D. Virus-induced chromosomal alterations in mammals and man. - In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man. (Ed. by F.Vogel, G.Röhrborn), Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1970, p.420-432.

B r e s l o w B.E., G o l d s b y R.A. Isolation and characterization of thymidine transport mutants of Chinese hamster cells. - Exptl Cell Res., 1969, v.55, N 3, p.339-346.

B r i n k R.A. Paramutation. - Ann. Rev. Genet., 1973, v.7, p.129-152.

B r u s i c k D.J., M a y e r V.W. New developments in mutagenicity screening techniques using yeast. - In: Environm. Health Persp., 1973, N 6. The Evaluation of Chemical Mutagenicity Data in Relation to Population Risk (Ed. by F.J.de Serres, W.Sheridan), p.83-99.

C a r c i n o g e n s are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1973, v.70, N 8, p.2281-2285. Auth.: Ames B.N. Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D.

C o u c k e l l M.B., Y a n o f s k y C. Increased frequency of deletions in DNA polymerase mutants of Escherichia coli. - "Nature", 1970, v.228, N 5272, p.633-635.

C o x E.C. Mutator gene studies in Escherichia coli: the mutM gene. - "Genetics", 1973, v.73, Suppl., p.67-80.

D a v i d s o n R.L., B i c k M.D. Bromodeoxyuridine dependence - a new mutation in mammalian cells. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1973, v.70, N 1, p.138-142.

D e l e t i o n of thymidine kinase activity from L-cells resistant to bromodeoxyuridine. - Exptl Cell Res., 1963, v.31, N 2, p.297-312. Auth. Kit S., Dubbs D.R., Piekarski L.J., Hsu T.C.

D r a k e J.W. Mutagenic mechanisms. - Ann. Rev. Genet., 1969, v.3, p.247-268.

D r a k e J.W. The Molecular Basis of Mutation. San-Francisco, Holden-Day, 1970. 273 p.

D r a k e J.W. The genetic control of spontaneous and induced mutation rates in bacteriophage T4. - Genetics, Suppl., 1973, v.73, p.4-64.

D r a k e J.W., G r e e n i n g E.O. Suppression of chemical mutagenesis in bacteriophage T4 by genetically modified DNA polymerases. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1970, v.66, N 3, p.823-829.

E n d o E., T a k a h a s h i K. Identification and property of the mutagenic principle formed from a food-component, methylguanidine, after nitrosation in simulated gastric juice. - Biochem. Biophys Res. Comm., 1971, v.54, N 4, p.1384-1392.

E n g e l W., K r o n e W., W o l f U. Die Wirkung von Thiosemicarbazid, Hydroxylamin und Bromdesoxyuridin auf menschliche Chromosomen in vitro. - Mutation Res., 1967, v.4, N 3, p.353-368.

E y r i n g H., J o h n s o n F.H. The elastomeric rack in biology. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1971, v.68, N 10, p. 2341-2344.

- Fincham J.R.S. Localised instabilities in plants - a review and some speculations. - Genetics, Suppl., 1973, v.73, p.195-205.
- Freese E.B. The mutagenic effect of hydroxyaminopurine derivatives on phage T4. - Mutation Res., 1968, v.5, N 2, p.299-301.
- Gass K.B., Cozzarelli N.R. Further genetic and enzymological characterization of the three *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid polymerases. - J. Biol. Chem., 1973, v.284, N 22, p.7688-7700.
- Green M.M. Some observations and comments on mutable and mutator genes in *Drosophila*. - Genetics, Suppl., 1973, v.73, p.187-194.
- Hall R.W., Brammar W.J. Increased spontaneous mutation rates in mutants of *E. coli* with altered DNA polymerase III. - Mol. Gen. Genet., 1973, v.121, N 3, p.271-276.
- Hall Z.W., Lehman I.R. An in vitro transversion by mutationally altered T4-induced DNA polymerase. - J. Mol. Biol., 1968, v.36, N 3, p.321-333.
- Hittelman W.N. Absence of chromosome breakage after deoxyribonuclease treatment. - Mutation Res., 1972, v.14, N 4, p.443-446.
- Howard-Flanders P. DNA repair and recombination. - Brit. Med. Bull., 1973, v.29, N 3, p.226-235.
- Hsu T., Somers C. Effect of 5-bromodeoxyuridine on mammalian chromosomes. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1961, v.47, N 3, p.396-403.
- Hsu T.C., Somers C.E. Properties of L cells resistant to 5-bromodeoxyuridine. - Exptl Cell Res., 1962, v.26, N 2, p.404-410.
- Ishii Y., Kondo S. Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in *Escherichia coli* strains with different DNA repair capacities. - Mutation Res., 1972, v.16, N 1, p.13-25.
- Juliani M.H., Costa S.O.P., Bacila M. Non-chromosomal respiratory deficient mutants induced by guanidine hydrochloride in *Saccharomyces cerevisiae*. - Biochem. Biophys Res. Comm., 1973, v.53, N 2, p.531.
- Kaufman B.P., Gay H. Induction by 5-bromodeoxyuridine of sex-linked lethal mutations in spermatogenous cells of *Drosophila melanogaster*. - Mutation Res., 1970, v.10, N 6, p.591-595.
- Kondo S. Evidence that mutations are induced by errors in repair and replication. - Genetics, Suppl., 1973, v.73, p.109-122.
- Kondo S., Ichikawa H. Evidence that pretreatment of *Escherichia coli* cells with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine enhances mutability of subsequently infecting phage. - Mol.Gen.Genet., 1973, v.126, N 4, p.319-324.
- Legator M.S., Flamm W.G. Environmental mutagenesis and repair. - Ann. Rev. Biochem., 1973, v.42, p.683-708.
- Lewis C.M., Tarrant G.M. Induction of mutation by 5-fluorouracil and amino acid analogues in *Ustilago maydis*. - Mutation Res., 1971, v.12, N 4, p.349-356.
- Lindgren D. The temperature influence on the spontaneous mutation rate, I. Literature review. - "Hereditas", 1972, v.70, N 1, p.165-178.

- L o m a x C.A., W o o d s R.A. Mutant of yeast sensitive to 2,6-diaminopurine. - J. Bacteriol., 1969, v.100, N 2, p.817-822.
- L o n g w o r t h J.W. Stereochemical features of thymidyl-photodimerization in the Watson-Crick DNA helix. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1968, v.59, N 3, p.829.
- L o p r i e n o N. Specificity of chemical mutagens at the DNA level. - Scientia, 1971, v.106, N 1, p.1-10.
- M a g e e P.N., B o r n e s J.M. Канцерогенные нитрозосоединения. - В кн.: Успехи в изучении рака. М., "Мир", 1971, т.10, с.242-323.
- M a h l e r H.R., P e r l m a n P.S. Mitochondrial membranes and mutagenesis by ethidium bromide. - J. Supramolecular Struct., 1972, v.1, N 1, p.105-124.
- M e i s t r i c h M.L., D r a k e J.W. Mutagenic effects of thymine dimers in bacteriophage T4. - J. Mol. Biol., 1972, v.66, N 1, p.107-114.
- M u t a n t s of yeast with enhanced spontaneous mutation rates. - Genetics, Suppl., 1973, v.73, p.141-151. - Von Borstel R.C., Quah S.-K., Steinberg C.M., Flury F., Gottlieb D.J.
- N a k a m u r a H., S u g a n u m a A. Membrane mutation associated with sensitivity to acriflavine in Escherichia coli. - J. Bacteriol., 1972, v.110, N 1, p.329-335.
- N i c h o l s W.W. Virus-induced chromosome abnormalities. - Ann. Rev. Microbiol., 1970, v.24, p.479.
- O r g e l L.E. Ageing of clones of mammalian cells. - "Nature", 1973, v.243, N 5408, p.441-445.
- P a o l e t t i C., C o u d e r H., G u e r i n e a u M. A yeast mitochondrial deoxyribonuclease stimulated by ethidium bromide. - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, v.48, N 4, p.950.
- P a t o n G.R., A l l i s o n A.C. Chromosome breakage by deoxyribonuclease. - "Nature", 1970, v.227, N 5259, p.707-708.
- P r a k a s h L., S h e r m a n F. Mutagenic specificity: reversion of iso-1-cytochrome c mutants of yeast. - J. Mol. Biol., 1973, v.79, N 1, p.65-82.
- R o s e A.H. (ed.) Thermobiology. London, New York, Academic Press, 1967.
- S a l g a n i k R.I. Some possibilities of mutation control concerned with local increase of DNA sensitivity to chemical mutagens. - Biol. Zentralbl., 1972, v.91, N 1, p.49-59.
- S h i m a d a K., W e i s b e r g R., G o t t e s m a n M. E. coli mutants produced by the insertion of bacteriophage DNA. - "Genetics" Suppl., 1973, v.73, p.81-83.
- S i e g e l E.C., K a m e l F. Reversion of frameshift mutations by mutator genes in Escherichia coli. - J. Bacteriol., 1974, v.117, N 3, p.994-1001.
- S i l v e r S. Acriflavine resistance: a bacteriophage mutation affecting the uptake of dye by the infected bacterial cells. - Proc Natl Acad. Sci. USA, 1965, v.53, N 1, p.24-30.
- S i l v e r S. Acridine sensitivity of bacteriophage T2: a virus gene affecting cell permeability. - J. Mol. Biol., 1967, v.29, N 1, p.191-202.

Silver S., Levine E., Pilelman P.M. Acridine binding by *Escherichia coli*: pH dependency and strain differences. - J. Bacteriol., 1968, v.95, N 2, p.333-339.

Singer B., Fraenkel-Conrat H. The role of conformation in chemical mutagenesis. - Progr. Nucleic acid Res. Mol. Biol., 1969, v.9, p.1-29.

Sora S., Panzeri L., Magni G.E. Molecular specificity of 2-aminopurine in *Saccharomyces cerevisiae*. - Mutation Res., 1973, v.20, N 2, p.207-213.

Springate C.F., Loeb L.A. Mutagenic DNA polimerase in human leukemic cells. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1973, v.70, N 1, p.245-249.

Stafford R.S., Donnellian J.E., Jr. Photochemical evidence for conformation changes in DNA during germination of bacterial spores. - Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1968, v.59, N 3, p.822-828.

Starlinger P., Saedler H. Insertion mutations in microorganisms. - "Biochimie", 1972, v.54, N 2, p.177-185.

Talmud P., Lewis D. Mutagenicity of amino acid analogues in eukaryotes. - "Nature", 1974a, v.249, N 5457, p.563-564.

Talmud P., Lewis D. The mutagenicity of amino analogues in *Coprinus lagopus*. - Genet Res., 1974b, v.23, N 1, p.47-62.

Tessman I. Mutagenic treatment of double- and single-stranded DNA phages T4 and S13 with hydroxylamine. - "Virology", 1968, v.35, N 2, p.330-333.

Tokunaga C. The effects of low temperature and aging on nondisjunction in *Drosophila*. - "Genetics", 1970, N 1, p. 75-94.

Wersuhn G. Temperatur als Ursache spontaner Chromosomenaberrationen. - "Naturwiss.", 1967, Bd. 54, N 1, S. 27.

Whitfield B.L., Billen D. In vivo methylation of *Escherichia coli* DNA following ultraviolet and X-irradiation. - J. Mol. Biol., 1972, v.63, N 3, p.363-372.

Witkin E.M., George D.L. Ultraviolet mutagenesis in Pol A and Uvr A Pol A derivatives of *Escherichia coli* B/r: evidence for an inducible error-prone repair system. - "Genetics", Suppl., 1973, v.73, p.91-108.

Yee B., Tsuyumi S., Adams B.G. Biological effects of dimethyl sulfoxide on yeast. - Biochem. Biophys Res. Comm., 1972, v.49, N 5, p.1336.

Zamenhof S., de Giovanni R., Rich K. *Escherichia coli* containing unnatural pyrimidines in its deoxyribonucleic acid. - J. Bacteriol., 1956, v.71, N 1, p.60-69.